

Е. Ф. Панарин<sup>1</sup>, Н. П. Иванова<sup>1</sup>, А. Т. Белохвостова<sup>2</sup>, Л. С. Потапенкова<sup>2</sup>**СИНТЕЗ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА СОПОЛИМЕРОВ N-ВИНИЛПИРРОЛИДОНА С ВИНИЛСАХАРИДАМИ**Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург;  
НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова Минздрава РФ, Санкт-Петербург

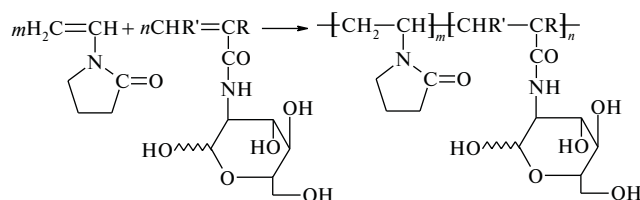
Поиск новых иммуностимулирующих препаратов, в том числе среди синтетических водорастворимых полимеров, имеет важное значение для современной иммунологии в связи с ростом заболеваний, сопровождающихся иммунодефицитным состоянием.

Известно, что иммуностимулирующими свойствами обладают неионогенные макромолекулы, а также поликатионы и полианионы, например, сополимеры винилпирролидона с акриловой кислотой [1–3]. Иммуностимулирующие свойства выявлены у ряда полисахаридов — декстрана [4], хитозана [5], а также у синтетических поливинилсахаридов — полиметакрилоилглюкозы и полиметакрилоиламидоглюкозы (ПМАГ) [6]. При этом на уровень активности оказывала влияние не только молекулярная масса полимера, но также тип химической связи между углеводным фрагментом и полимерной цепью. При поиске новых иммуностимуляторов полимерного типа несомненный интерес могут представлять и другие водорастворимые полимеры, имеющие в боковой цепи углеводные фрагменты, способные обеспечивать взаимодействие макромолекулы с иммунокомпетентными клетками не только за счет электростатического взаимодействия, но вследствие образования водородных связей.

Данная работа посвящена синтезу новых водорастворимых сополимеров N-винилпирролидона (ВП) с метакрилоил(МаГл)- и кротоноил(КрГл)амидоглюкозой, различающихся характером распределения звень-

ев, несущих углеводные фрагменты вдоль полимерной цепи, и изучению их иммуномодулирующих свойств.

Кротоноиламидоглюкозу (R = H, R' = CH<sub>3</sub>) и метакрилоиламидоглюкозу (R = CH<sub>3</sub>, R' = H) получили путем ацилирования глюкозамина [7]. Синтез сополимеров осуществляли путем радикальной сополимеризации мономеров в ДМФА или воде. В первом случае в качестве инициатора радикальной полимеризации использовали динитрил азобисизомасляной кислоты (ДАК), а при сополимеризации в воде — водорастворимый инициатор гидрохлорид азо-бис(2-метилпропионамида) [8].

R или R' = H или CH<sub>3</sub>

Строение и состав полученных сополимеров подтверждены методом ПМР. Условия синтеза и характеристики полученных сополимеров представлены в табл. 1.

Известно, что производные метакриловой и кротоновой кислот резко отличаются по своей активности в

Таблица 1  
Условия сополимеризации N-винилпирролидона с метакрилоиламидоглюкозой (МаГл) и кротоноиламидоглюкозой (КрГл) и характеристики полученных сополимеров (*m*<sub>2</sub> — содержание МаГл или КрГл в сополимере)

№ опыта	Условия сополимеризации			Выход сополимера, вес. %	Свойства сополимеров				
	Концентрация сомономера, мол. %	Концентрация растворителя, вес. %	Время, ч		<i>m</i> <sub>2</sub> , мол. %	[η] (ДМФА, 25 °С)	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> (C <sup>10</sup> , H <sub>2</sub> O)	<i>M</i> · 10 <sup>-3*</sup>	
1	МаГл	8,0	15	20	96	8,0	0,43	+ 11,6	183
2		18,5	15	5	97	14,4	0,32	+ 18,4	107
3		25	15	4	67	20,0	0,08	+ 23,0	
4		50	18	4	76	40,0	0,10	+ 40,5	
5		10	20	4,5	85	9,5	0,23	- 12,1	59
6	КрГл	12	20	24	81	7,5	0,12	- 11,2	18
7		15	20	20	96	11,0	0,10	- 14,0	13
8		25	15	24	76	18,5	0,11	- 16,5	15
9		"	20	"	50	17,0	0,09	- 18,0	11
10		10	20	43	85	6,0	0,14	...	24
11		20	20	48	83	17,0	0,065	...	6

Во всех опытах, кроме опыта 8, растворитель — ДМФА, инициатор — ДАК. Кроме опытов 5 и 8, концентрация ДАК 1 вес.%, в опыте 5 — 3 вес.%, в опыте 8 растворитель — вода; инициатор — ГУАНИД, концентрация 1 вес. %.

\*/Использованы константы уравнения Марка — Куна — Хаувинка для поливинилпирролидона в ДМФА: *K* = 5,49 · 10<sup>-4</sup> г/дл, α = 0,55 [13].

реакциях сополимеризации, в частности с ВП. Как следствие этого, результирующие сополимеры имеют различное распределение вдоль цепи мономерных звеньев, несущих глюкозаминный остаток. Данные по составу сополимеров (табл. 1) подтверждают известные сведения о разной активности кротоноильного и метакрилоильного радикалов при сополимеризации с ВП. В случае сополимеров ВП с кротоноиламидоглюкозой полимер содержит микроблоки звеньев ВП, разделенные единичными звеньями КрГл, а в случае сополимера ВП с МаГл велика вероятность наличия микроблоков МаГл. В результате низкой сополимеризационной активности КрГл при указанных условиях

в сополимер входит не более 18 мол. % звеньев КрГл, тогда как в случае МаГл удается получать сополимеры с высоким содержанием винилсахарида. Путем варьирования условий сополимеризации (соотношение мономеров, концентрация инициатора и растворителя) получены сополимеры с диапазоном молекулярных масс от  $8 \cdot 10^3$  до  $150 \cdot 10^3$ .

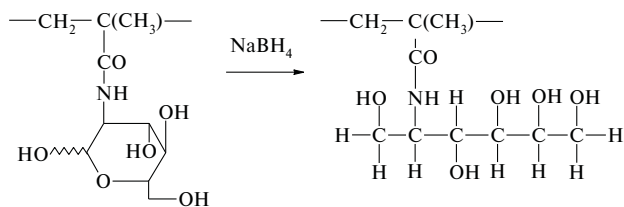
С целью изучения влияния структуры углеводного остатка на иммуномоделирующую активность проведено гидрирование звеньев МаГл боргидридом натрия, обеспечившее перевод их из циклической в ациклическую форму.

Таблица 2

**Влияние сополимеров N-винилпирролидона с углеводсодержащими мономерами на антителигенез**

Сополимер (состав, моль%)	Дозы, мг/кг	Способ введения	Клеточность селезенки ( $\times 10^7$ )	Число АОК на $10^6$ ядерных клеток селезенки ( $\times 10^6$ )	Число АОК на селезенку ( $\times 10^9$ )	КИО
ПМАГ	50	Внутрибрюшинно	$22,9 \pm 6,5$	$415,8 \pm 33,5^*$	$94,2 \pm 31,4$	1,4
	25		$27,6 \pm 7,1$	$249,5 \pm 20,4$	$70,9 \pm 24,2$	0,87
	10		$23,1 \pm 7,0$	$203,3 \pm 39,2$	$48,9 \pm 23,8$	0,71
	5		$26,9 \pm 5,3$	$329,9 \pm 23,2$	$91,0 \pm 26,9$	1,1
	Контроль (ЭБ)		$38,4 \pm 13,3$	$287,1 \pm 29,4$	$94,1 \pm 1,4$	
ВП — МаГл (90 : 10)	50	—“—	$83,5 \pm 14,3^*$	$340,3 \pm 10,6^*$	$284,9 \pm 54,9^*$	1,3*
	25		$51,6 \pm 19,9$	$277,9 \pm 11,9$	$144,3 \pm 59,4$	1,1
	10		$56,2 \pm 36,0$	$343,4 \pm 44,2$	$134,9 \pm 63,3$	1,3
	5		$51,8 \pm 25,5$	$244,0 \pm 41,0$	$165,4 \pm 119,4$	0,9
	Контроль		$24,3 \pm 10,1$	$258,5 \pm 21,8$	$60,6 \pm 21,4$	
ВП — МаГл (50 : 50)	50	—“—	$13,7 \pm 3,2$	$430,0 \pm 54,9^*$	$53,0 \pm 8,1$	2,0*
	25		$18,2 \pm 4,8$	$382,5 \pm 52,9^*$	$68,8 \pm 26,3$	1,8*
	10		$20,1 \pm 1,2$	$307,1 \pm 12,4$	$61,3 \pm 0,75$	1,5
	5		$8,6 \pm 1,6$	$240,0 \pm 46,7$	$17,7 \pm 6,2$	1,1
	Контроль		$21,4 \pm 2,9$	$210,3 \pm 52,2$	$46,2 \pm 34,6$	1,3
ПМАГ гидрированный	50	—“—	$38,1 \pm 11,7$	$157,1 \pm 24,5^*$	$54,7 \pm 20,2$	2,3*
	25		$56,0 \pm 14,4$	$56,8 \pm 4,8$	$30,3 \pm 7,9$	0,8
	10		$35,4 \pm 4,5$	$52,4 \pm 4,4$	$18,0 \pm 2,2$	0,7
	5		$57,3 \pm 18,3$	$55,2 \pm 8,4$	$24,1 \pm 2,6$	0,8
	Контроль		$30,4 \pm 10,6$	$68,5 \pm 3,9$	$21,5 \pm 8,4$	
ВП — КаГл (90 : 10)	50	—“—	$23,2 \pm 1,9$	$108,1 \pm 16,7^*$	$21,0 \pm 6,7$	0,71*
	25		$17,8 \pm 3,6$	$59,8 \pm 7,7^*$	$11,2 \pm 4,6$	0,39*
	10		$22,5 \pm 1,4$	$95,3 \pm 17,4^*$	$22,1 \pm 10,0$	0,63*
	5		$23,8 \pm 3,6$	$69,1 \pm 9,1^*$	$16,9 \pm 5,9$	0,45*
	Контроль		$9,3 \pm 1,3$	$151,7 \pm 13,3$	$14,7 \pm 4,6$	
ПМАГ	50	Перорально	$42,4 \pm 11,3$	$193,0 \pm 21,9$	$74,8 \pm 5,1$	1,36
	25		$43,5 \pm 13,9$	$203,8 \pm 27,7$	$80,4 \pm 22,4$	1,44
	10		$40,8 \pm 3,1$	$129,8 \pm 9,3$	$53,6 \pm 12,9$	0,9
	5		$53,0 \pm 13,9$	$81,5 \pm 8,9^*$	$44,5 \pm 15,5$	0,6
	Контроль		$50,3 \pm 8,8$	$141,9 \pm 10,4$	$68,7 \pm 4,4$	
ВП — МаГл (50 : 50)	50	—“—	$18,9 \pm 1,3$	$328,7 \pm 12,8$	$61,0 \pm 6,8$	1,1
	25		$19,8 \pm 4,5$	$315,2 \pm 26,7$	$60,9 \pm 10,5$	1,0
	10		$13,7 \pm 1,5^*$	$306,2 \pm 26,9$	$43,4 \pm 12,0$	1,0
	5		$24,2 \pm 5,2$	$152,1 \pm 15,9^*$	$36,5 \pm 13,0$	0,5
	Контроль		$30,4 \pm 4,1$	$304,0 \pm 17,0$	$93,5 \pm 22,2$	

\*  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой.



Результаты исследования иммуномодулирующего действия синтезированных полимеров представлены в табл. 2, в которую включены также ранее опубликованные нами [6] данные по влиянию на антителиогенез гомо-полимера ПМАГ и его гидрированной формы.

Установлено, что внутрибрюшинное введение большинства испытанных полимеров (кроме ПМАГ и ВП: МаГл = 50:50) вызывает достоверное увеличение числа АОК. При этом наиболее выраженное усиление антителиогенеза отмечается при введении гидрированного ПМАГ в дозе 50 мг/кг (КИО = 2,3) и ВП:МаГл в соотношении 50:50 в дозе 50 мг/кг (КИО = 2,0) и 25 мг/кг (КИО = 1,8).

Противоположные результаты получены при исследовании влияния ПМАГ и ВП: МаГл = 50 : 50 на антителиогенез при их пероральном введении. В этом случае в дозах 5 мг/кг они достоверно снижают число АОК селезенки.

Снижение антителиогенеза отмечается под влиянием полимера ВП: МаГл = 50 : 50 независимо от способа его введения (снижение клеточности селезенки при дозе 5 мг/кг внутрибрюшинно и 10 мг/кг перорально).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что действие синтезированных полимеров на способность клеток селезенки продуцировать антигена зависит от дозы и способа их введения, а также от соотношения ВП и МаГл в цепи полимера.

#### Экспериментальная химическая часть

Оптическое вращение измерено на ультраспектрополяриметре Рерол – 60 (Англия) при 589 им (линия натрия) и 20 °С.

Спектры ПМР сняты на приборе JEOLC-60Н в D<sub>2</sub>O.

Инициатор (ДАК) дважды перекристаллизовывали из смеси этанол — хлороформ, 3 : 1, т.пл. 103 °С.

N-Винилпирролидон очищали вакуумной перегонкой над КОН в токе аргона, использовали фракцию, собранную при 70 °С (3 мм рт.ст.).

Диметилформамид очищали по методике [9].

**Метакрилоиламидоглюкоза (МаГл)** получена обработкой солянокислого глюкозамина хлорангидридом метакриловой кислоты в метаноле в присутствии триэтиламина [7]. Выход 70 %; т.пл. 197 – 198 °С.

**Кротоноиламидоглюкоза (КрГл).** Для ацилирования используют кротоновый ангидрид. Выход неочищенного продукта 85 %. КрГл очищают на колонке с силикагелем ( $h = 70$  см,  $d = 25$  мм), используя в качестве элюента смесь спирт — хлороформ, 1 : 1. После

отгонки растворителя и сушки в вакууме получают КрГл с т.пл. 178 – 181 °С. C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>O<sub>6</sub>.

Контроль чистоты МаГл и КрГл осуществляют методом ТСХ: элюент — PrOH — H<sub>2</sub>O, 7 : 1; обнаружение проводят раствором нингидрина в смеси BuOH — пиридин, 95 : 5 [10].

**Сополимеризация ВП с МаГл и КрГл.** Процесс ведут в запаянных ампулах в растворе ДМФА. Сополимеры выделяют из реакционной среды осаждением диэтиловым эфиром. Состав сополимеров был установлен методом ПМР по интенсивности сигналов  $\delta$ , м.д.: МаГл, 1,17 (CH<sub>3</sub>) и 5,18 (H-1); ВП, 2,30 (H-3), 2,02 (H-4) и 3,3 (H-5); КрГл 1,05 (CH<sub>3</sub>) и 5,30 (H-1). Для определения состава сополимеров использовали также методику количественного определения аминокислот реакцией с диметиламинобензальдегидом [11].

**Гидрирование полиметакрилоиламидоглюкозы.** Растворяют 1 г полимера в воде и обрабатывают 10-кратным избытком NaBH<sub>4</sub> при комнатной температуре. После нейтрализации разбавленной соляной кислотой раствор диализируют несколько дней для удаления солей и борной кислоты. О раскрытии цикла в полиметакрилоиламидоглюкозе свидетельствует отсутствие сигнала в спектре ПМР при  $\delta$  5 м.д. (DMCO-d<sub>6</sub>), который характерен для протона H-1 при аномерном углероде.

#### Экспериментальная биологическая часть

Опыты проводили на инбридных мышках-самцах линии VAZB/C разведения питомника Рапполово.

Для изучения иммуномодулирующего действия использовали метод локального гемолиза в геле Эрне-Нордина, позволяющий проводить количественную оценку влияния различных препаратов на образование антителиобразующих клеток (АОК) к эритроцитам барана (ЭБ) у мышей [12]. При постановке реакции использовалась агароза А. Группам из 3 животных вводили исследуемые полимеры в дозах 50, 25, 10 и 5 мг/кг однократно и через 30 мин ЭБ в дозе ( $5 \times 10^8$ ) в 0,5 мл физиологического раствора. Контролем служили группы мышей, которым вводили только ЭБ. Оценку действия полимеров на иммунный ответ проводили на 4-е сутки после иммунизации на основании результатов исследования клеточности селезенки, числа АОК на 10<sup>6</sup> ядерных клеток селезенки, числа АОК на селезенку и подсчета коэффициента иммунного ответа (КИО) по следующей формуле:

КИО = число АОК на 10<sup>6</sup> клеток селезенки в опыте / число АОК на 10<sup>6</sup> клеток селезенки в контрольной группе мышей.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (Грант № 98-03-33259).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Р. И. Аталлауханов, М. И. Губарев, В. В. Гончаров, *Иммунол.*, № 2, 27 – 30 (1995).
2. Р. В. Петров, Р. М. Хаитов, *Искусственные вакцины*, Знание, Москва (1986).
3. И. Н. Топчиева, В. И. Ерохин, Е. Б. Бурлакова и др., *Изв. АН СССР, Сер. биол.*, № 6, 918 – 924 (1990).
4. Н. Г. Синилова, А. П. Дуклищева, Е. И. Ромашевская и др., *Вопр. мед. химии*, № 6, 103 – 107 (1987).
5. В. Ю. Скворцов, В. Г. Галактионов, Т. Б. Мастернак и др., *Иммунол.*, № 4, 22 – 25 (1984).
6. Е. Ф. Панарин, Н. П. Иванова, А. Т. Белохвостова и др., *Иммунол.*, № 2, 26 – 28 (1999).
7. Г. М. Павлов, Е. В. Корнеева, Н. А. Михайлова и др., *Высокомолек. соедин., сер. А*, **35**(10), 1647 – 1650 (1993).
8. Susumo Harada, Sahuro Hasegawa, *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, **5**(1), 27 – 31 (1984).
9. *Лабораторная техника органической химии*, Б. М. Кейл (ред.), Мир, Москва (1966), с. 596.
10. А. Е. Gal, *Analyt. Biochem.*, **24**, 452 – 461 (1968).
11. D. E. S. Stewart-Tull, *Biochem. J.*, **109**(1), 13 – 18 (1968).
12. K. N. Jerne, A. A. Nordin, *Sci.*, **140**, 405 (1963).
13. А. С. Боймирзаев, В. В. Нестеров, Б. Г. Беленький, *Высокомолек. соедин.*, **28A**(12), 2623 – 2629 (1986).

Поступила 16.10.2000